

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Publication number:

**0 245 045 B1**

(12)

## EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

(45) Date of publication of patent specification: **03.11.93** (51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **A61K 39/385**

(21) Application number: **87303928.3**

(22) Date of filing: **01.05.87**

(54) **Immunogenic conjugates.**

(30) Priority: **05.05.86 US 859975**

(43) Date of publication of application:  
**11.11.87 Bulletin 87/46**

(45) Publication of the grant of the patent:  
**03.11.93 Bulletin 93/44**

(84) Designated Contracting States:  
**AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE**

(56) References cited:  
**WO-A-86/01228**  
**US-A- 4 356 170**  
**US-A- 4 673 574**

**CHEMICAL ABSTRACTS**, vol. 103, 1985, Co-  
lumbus, OH (US); P. ANDERSON et al., p. 466,  
no. 86144e&NUM;

**JOURNAL OF IMMUNOLOGY**, vol. 127, no. 3,  
September 1981; H.J. JENNINGS et al., pp.  
1011-1018&NUM;

**INFECTION AND IMMUNITY**, vol. 39, no.1, Jan-  
uary 1983; P. ANDERSON et al., pp.  
233-238&NUM;

**ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS**, vol. 181, 1977;

**B.A. SCHWARTZ et al.**, pp. 542-549&NUM;

(73) Proprietor: **PRAXIS BIOLOGICS, INC.**  
**30 Corporate Woods**  
**Rochester New York 14623(US)**

(72) Inventor: **Anderson, Porter W.**  
**40 Alpine Street**  
**Rochester, NY 14620(US)**  
Inventor: **Eby, Ronald John**  
**297 West Squire Drive**  
**Rochester, NY 14623(US)**

(74) Representative: **Senior, Janet et al**  
**Abel & Imray**  
**Northumberland House**  
**303-306 High Holborn**  
**London WC1V 7LH (GB)**

Note: Within nine months from the publication of the mention of the grant of the European patent, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to the European patent granted. Notice of opposition shall be filed in a written reasoned statement. It shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid (Art. 99(1) European patent convention).

**EP 0 245 045 B1**

## Description

## FIELD OF THE INVENTION

5 This invention relates to the field of novel vaccine compositions, processes for producing them and methods for immunization of young warm-blooded animals, including humans, against infections and disease caused by bacteria, including, for example, *Haemophilus influenzae* type b, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* serogroups A and C, *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3, 6, 12, 14, 19, 23 and 51, and *Pseudomonas*.

10

## BACKGROUND OF THE INVENTION

It is known that purified bacterial capsular polymers (CP) generally are immunogenic in mature humans and animals and can be used as vaccines against the corresponding systemic infections. As used in this application, the term "capsular polymers" refers to sugar-containing polymers, such as polymers of sugars, sugar acids, amino sugars, polyhydric alcohols and sugar phosphates, and does not refer to amino acid-containing polymers. These "capsular polymers" are frequently referred to in the medical literature as "capsular polysaccharides", though they may contain linkages other than glycosidic linkages and constituents other than sugars such as those listed above.

20 The capsular polymers of different bacteria vary widely in immunogenicity in the first year of human life. Some are moderately active, such as *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 and *Neisseria meningitidis* serogroup A. The susceptibility to systemic infection by encapsulated bacteria is greater in the first year of life. The immunogenic response to many bacterial capsular polymers in children is age dependent, i.e., immunocompetence to CP increases to adult levels by about six years of age.

25 Among the inactive CP are those of *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6 and 12, and *Neisseria meningitidis* serogroup C. Examples of CPs which give an intermediate response in infants are *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19 and 51.

Various investigators have isolated and purified intact capsular polymers which may be useful in or as vaccines. For example, U.S. Pat. 4,220,717 describes a process for the isolation and purification of immunologically active polyribosyl ribitol phosphate (PRP) from the capsular polymer of *H. influenzae* b. 30 Additionally, U.S. Pat. 4,210,641 relates to polysaccharide extracts of *H. influenzae* having an apparent molecular weight greater than 200,000 daltons and composed principally of galactose, glucose and mannose and containing a small amount of osamines.

Several researchers have utilized these and other intact capsular polymers in formulations to achieve better immunological responses. For example, U.S. Pat. 4,196,192 discloses a vaccine containing purified intact PRP and whole *Bordetella pertussis* bacteria. This approach to increasing immunogenicity resulted in enhanced levels of anti-PRP and anti-pertussis antibodies in young mammals.

Other researchers have studied conjugation of capsular polymers to carrier proteins in an effort to enhance antibody formation by the so-called "carrier effect". For example, Schneerson et al., J. Exper. Med. 152:361-376 (1980), describes *H. influenzae* b polymer-protein conjugates disclosed to confer immunity to invasive diseases caused by *H. influenzae* b. The reference documents the age-related immunological behavior of capsular polymers in infants and seeks to overcome this age-dependence by conjugation of the intact capsular polymer with a variety of proteins, including serum albumins, *Limulus polyphemus* hemocyanin and diphtheria toxin. The method of conjugation involves the use of a linking agent such as adipic dihydrazide.

45 Geyer et al., Med. Microbiol. Immunol. 165:171-288 (1979), prepared conjugates of certain *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide fragments to a nitro-phenylethylamine linker by reductive amination, and the derivatized sugar was then attached to proteins using azo coupling.

WO 8601228 and US 4,673,574 both disclose an immunogenic conjugate which comprises the reductive amination product of an immunogenic capsular polymer fragment having a reducing end derived from the bacterial capsular polymer of a bacterial pathogen, and a bacterial toxin or toxoid. Infect & Immun (1983) 39(1) 233-238 discloses oligosaccharides made from *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and conjugated to CRM197 by reductive amination. J. Clin. Invest (1985) 76(1) 52-59 discloses that *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide was selectively hydrolysed to reducing oligosaccharides, and the fraction containing 3-10 ribosylribitolphosphate repeating units was conjugated by reductive amination to diphtheria toxin, its nontoxic derivative CRM197 or diphtheria toxoid.

55 US 4,356,170 and J Immunol (1981) 127(3) 1011-1018 both relate to the same subject-matter. Both documents describe antigenic conjugates in which an intact capsular polymer having a molecular weight

greater than 2000 daltons is attached, via a terminally-introduced aldehyde group, to an amine group of tetanus toxoid by reductive amination. Care was taken to avoid fragmentation of the intact capsular polymer used to prepare the antigenic conjugates. The method of covalent attachment is said to be specific in that the only covalent attachment between the toxoid and the capsular polysaccharide occurs at the terminally-located aldehyde group of the polysaccharide (see, for example, J Immunol (1981) 127(3) 1011-1018 at 1011, col. 2, lines 3-6; at 1012, col. 1, lines 34-44). The references further assert that the "monofunctional group approach" to coupling employed "avoids cross-linking" between the polysaccharide and the proteins (see, for example, id., line 42).

## 10 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to the covalent attachment of capsular polymer fragments derived from bacterial capsular polymers to bacterial toxins or toxoids by means of reductive amination. As used in the present application, the term "toxoid" means a form of a toxin which has the antigenicity of the toxin without its toxicity.

The immunogenic conjugates of the invention are prepared by first forming reducing end groups on fragments of the capsular polymers and reacting these with amine groups of the bacterial toxin or toxoid by reductive amination. The reducing end groups may be formed by any suitable method, including selective hydrolysis, e.g., by acids or enzymes, and by oxidative cleavage, e.g., by periodate or related oxygen acids. The conjugation is preferably achieved by reductive amination in an aqueous solution containing cyanoborohydride anions.

The immunogenic conjugates of the invention may be formulated with a pharmaceutically acceptable carrier to produce a vaccine which elicits effective levels of anti-capsular antibody formation in young mammals, including humans. The vaccine may be utilized to induce active immunization against systemic infection in young mammals caused by the respective encapsulated bacteria by administering an immunogenic amount of the conjugate to the mammal.

The immunogenic conjugates have been found to be less age dependent than the capsular polymers alone, and are useful for the active immunization of very young warm-blooded mammals against systemic infections by the respective encapsulated bacteria.

Furthermore, the immunogenic conjugates of the invention do not contain potentially toxic linking agents, such as adipic dihydrazide or p-nitro-phenyl-ethylamine, which have been used in conjugating carbohydrate to protein.

Finally, the immunogenic conjugates of the invention contain fragments of capsular polymers, not intact capsular polymers. The highly repetitive structure of capsular polymers may be in part responsible for their failure to expand the capacity for antibody production in infants. A conjugate of intact (highly polymerized) CP and protein may only partially overcome the immunologic disadvantages of CP alone.

On the other hand, the use of capsular polymer fragments on a carrier may circumvent the disadvantages of the repetitive structure. Additionally, the CP determinants of a conjugate having CP fragments are on the average closer to the carrier than are the CP determinants of conjugates having intact CP, and this proximity to carrier may be necessary for a more effective "carrier effect".

A further advantage lies in the use, for the protein carrier, of a bacterial toxin or toxoid against which children are routinely vaccinated, e.g., tetanus or diphtheria. Desired immunity to the toxin or toxoid is induced along with immunity against the pathogens associated with the capsular polymer.

It is to be understood that reference throughout this specification to any theory to explain the results described is not to limit the scope of the invention. Independent of the method by which the invention functions, the results and advantages described herein may be achieved by reference to the following detailed description.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The conjugates of the invention are formed by reacting reducing end groups of the capsular polymer fragment to primary amino groups of a bacterial toxin or toxoid to yield antigenic determinants of the capsular polymer covalently linked to the carrier protein. The reducing groups are formed by combinations of selective hydrolysis and specific oxidative cleavage, for example, selective hydrolysis followed by oxidative cleavage or oxidative cleavage followed by selective hydrolysis.

Antigenic fragments with at least one reducing end can be generated from capsular polymers by a variety of methods, depending upon the structural features of the particular capsular polymer. Limited oxidative cleavage by periodate (or related reagents such as paraperiodic acid, sodium metaperiodate and

potassium metaperiodate) will leave aldehydic termini; such an approach will be limited to polymers having vicinal dihydroxy groups. Hydrolysis of a glycosidic linkage produces a reducing sugar terminus. Such hydrolysis can be most specifically accomplished enzymatically by glycosidases, but this application would be restricted to a relatively few capsular polymers, e.g., *Streptococcus pneumoniae* 8, for which glycosidases are known. Acidic hydrolysis is commonly used for hydrolysis of glycosidic linkages. The utility of this approach would be limited if the polymer contains acid-sensitive non-glycosidic linkages or if the polymer contains acid-sensitive branch linkages important to the antigenic specificity. Base hydrolysis can also be used if the polysaccharide contains base labile bonds to the glycosidic carbon such as phosphate, sulfate or ester linkages. The utility of this approach would be limited if the polymer contained other base sensitive non-glycosidic linkages.

Certain capsular polymers may lack vicinal dihydroxy groups which are susceptible to cleavage by periodate (or related oxygen acids). However, prior hydrolysis of such capsular polymers with acid, base or enzyme may liberate vicinal dihydroxy groups which would be susceptible to oxidative cleavage generally. For example, removal of pyruvic acid, acetates, formates, etc., by acid hydrolysis, or removal of sialic acid by enzyme cleavage, may be done prior to the oxidative cleavage step. This, of course, would be limited in application to those capsular polymers in which the groups modified are not important to antigenic specificity.

Where the capsular polymer is hydrolyzed to form capsular polymer fragments having only one functional aldehyde group, conjugation to a multifunctional protein (having at least two free amine groups) results in a conjugate in which a single molecule of the protein has one or more capsular polymer fragments covalently attached. It can readily be seen that the number of capsular polymer fragments attached to the protein can be routinely regulated by changes in the conditions of the conjugation reaction, including the relative concentration of capsular polymer fragments to protein and the overall concentration of the reactants. Of course, regulation of any reaction parameter, e.g., time, temperature, pH, etc., which affects the reactivity or rate of reaction will alter the final composition and structure of the conjugate.

When the capsular polymer fragment has at least one functional aldehyde group located on each end of the fragment (for example, as the result of oxidative cleavage of vicinal dihydroxy groups of a non-cyclic residue), conjugation to a multifunctional protein can result in several types of conjugate. For example, conjugation of such reactants has the potential for forming a lattice or network structure, particularly where there are many free amines on the protein and capsular fragments are in low molar excess to protein. The degree of crosslinking and overall size of the network or lattice can be regulated by routine variation of the conditions of the conjugation reaction.

The conjugation is carried out according to the reductive amination process of Schwartz and Gray, Arch. Biochem. Biophys. 181:542-549 (1977). Briefly, the process involves reacting the reducing capsular polymer fragment and bacterial toxin or toxoid in the presence of cyanoborohydride ions, or another reducing agent which will not reduce the reducing ends of interest nor adversely affect the toxin or toxoid or capsular polymer.

The cyanoborohydride ions (or their equivalent) act primarily as a mild selective reducing agent of the Schiff base intermediate formed between the carbonyl groups of the capsular polymer fragment and amino groups of the protein. A secondary effect of such ions is the slower reduction of any active aldehyde groups remaining on the capsular polymer fragments after conjugation has occurred. Optionally, after conjugation, additional cyanoborohydride ions (or their equivalent) may be added to reduce such unreacted free aldehyde groups. It is often desirable to add the stronger reducing agent, borohydride ion, after conjugation to ensure adequate reduction of the remaining carbonyl groups.

Thus, unlike previously employed conjugation procedures wherein the active molecules are joined by a linking agent which forms a part of the final product, the reducing anions utilized herein are not incorporated into the final product. This is important from the standpoint of controlling the potential toxicity (i.e., undesired immunogenicity) of the final product. Evidence of covalent linkage is demonstrated by the fact that the association between, for example, a PRP moiety and the carrier protein persists despite salting-out of the protein in the presence of 8 M urea, which has a great ability to disrupt non-covalent bonds.

Suitable carrier proteins are those which are safe for administration to young mammals and immunologically effective as carriers. Safety would include absence of primary toxicity and minimal risk of allergic complications. Diphtheria and tetanus toxoids fulfill these criteria; that is, suitably prepared, they are non-toxic and the incidence of allergic reactions is well documented. Though the risk of allergic reaction may be relatively significant for adults, it is minimal for infants.

In the "carrier effect" a weak antigen, by being attached to a stronger antigen as carrier (e.g., a heterologous protein), becomes more immunogenic than if it were presented alone. If an animal is previously immunized with the carrier alone, it may become "primed" for an enhanced response not only to

the carrier antigen but also the attached weaker antigen. Infants are routinely immunized with tetanus and diphtheria toxoids. Thus, they would be primed for subsequent presentation of a capsular polymer antigen conjugated to either of these toxoids.

In general, any heterologous protein could serve as a carrier antigen. However, certain bacterial toxins such as tetanus and diphtheria may have an additional advantage in that they are composed of two portions, one of which (the "binding" subunit) has a strong affinity for binding to mammalian cell surfaces. Conceivably, conjugation to such a "binding" protein would permit the carried antigen to more effectively initiate responses in cells of the immune system.

The carrier proteins to which the capsular polymer is conjugated may be native toxin or detoxified toxin (toxoid). Also, by relatively recent mutational techniques, one may produce genetically altered proteins which are antigenically similar to the toxin yet non-toxic. These are called "cross reacting materials", or CRMs. CRM<sub>197</sub> is noteworthy since it has a single amino acid change from the native diphtheria toxin and is immunologically indistinguishable from it.

A culture of *Corynebacterium diphtheria* strain C7 ( $\beta$ 197), which produces CRM<sub>197</sub> protein, has been deposited with the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland and has been assigned accession number ATCC 53281.

Conjugation of capsular polymer to native toxin may reduce toxicity, but significant toxicity may remain. Thus, further detoxification would be required. Conventional detoxification of protein toxins employs formalin, which reacts with free amino groups of the protein. Residual toxicity may still be a concern. Furthermore, spontaneous retoxification is possible with any particular lot of vaccine and remains an issue of concern with this approach.

Alternatively, native toxin may be detoxified with formalin to produce conventional toxoid before conjugation to capsular polymer. However, the prior formalin treatment reduces the number of free amino groups available for reaction with the reducing groups of the capsular polymer fragment. CRMs, thus, have significant advantages in that they have no inherent toxicity yet none of their amino groups is occupied by the formalin. A further advantage is that no biohazards exist in working with CRMs.

In the case of CRM<sub>197</sub>, which is immunologically identical to native toxin, treatment with formalin (though there is no need to detoxify) greatly enhances the immunological response. It is thought that this is due to stabilization of the molecule against degradation by mechanisms of the body and/or aggregation by cross-linking (immunogenicity of particles increases with size).

For all of the above reasons, tetanus and diphtheria toxins are prime candidates for carrier proteins, yet there are others which may also be suitable. Though these others may not have the history of safety found with diphtheria and tetanus, there may be other overwhelming reasons to use them. For instance, they may be even more effective as carriers, or production economics may be significant. Other candidates for carriers include toxins or toxoids of *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, pertussis and enterotoxigenic bacteria, including *Escherichia coli*.

Suitable carrier media for formulating a vaccine include sodium phosphate-buffered saline (pH 7.4) or 0.125 M aluminum phosphate gel suspended in sodium phosphate-buffered saline at pH 6 and other conventional media. Other pharmaceutical carriers suitable for use in vaccines are known in the art.

Generally, vaccines of the invention containing from about 5 to about 100  $\mu$ g, preferably about 10 to 50  $\mu$ g, are suitable to elicit effective levels of antibody against the capsular polymer in young warm-blooded mammals. Of course, the exact dosage would be determined by routine dose/response experimentation. Several small doses given sequentially would be expected to be superior to the same amount of conjugate given as a single injection.

The vaccines of the invention may be administered by injection to warm-blooded mammals of any age and are especially adapted to induce active immunization against systemic infections in young mammals caused by the pathogens *Haemophilus influenzae* type b, *Escherichia coli*, *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Streptococcus* and *Pseudomonas*.

The following is a non-limiting example of a method for the preparation of exemplary immunogenic conjugates of the present invention and their use in vaccines.

#### EXAMPLE: CONJUGATION OF PRP FRAGMENTS PRODUCED BY OXIDATIVE CLEAVAGE TO CRM<sub>197</sub>

In this example, the final conjugate comprises two components: fragments of PRP of reasonably well defined chain length covalently linked to the non-toxic, immunogenic diphtheria toxin CRM<sub>197</sub>. In this example, conditions of the periodate oxidation and isolation by ultrafiltration govern the chain length of the capsular polymer (PRP) fragments.

## EP 0 245 045 B1

The conjugate is constructed with capsular polymer fragments having an aldehyde group at both ends of the fragment. Thus, each fragment can be covalently linked to CRM at both ends, presumably at lysine residues of CRM. The structure of the product can, therefore, be considered a "lattice."

The composition and presumably the structure of the conjugate can be altered by changing the concentration of the two components in the conjugating chemical reaction.

The PRP used to produce the PRP fragments for the PRP-CRM conjugate vaccine had the following specifications:

Protein content	<1.0%
Nucleic acids content	≤1.0%
Endotoxin (LAL)	<1.0 EU/μg PRP
Molecular size (Kd)	<0.3 (Sephacrose® CL-4B) <0.6 (Sephacrose® CL-2B)

### Production Methods for PRP Fragments

a. A solution of PRP (5-7 mg/ml) was cooled to 4°C and 2M phosphate buffer pH 7.0 was added to make the final concentration 0.2M phosphate.

b. Sodium metaperiodate (0.2-0.3 moles I<sub>04</sub>/mole PRP) was added with rapid mixing, and the solution was incubated at 4°C overnight in the dark.

c. The reaction solution was ultrafiltered using a HIP30 hollow fiber (Amicon, 30,000Mw cut-off). The retentate was washed 4 times with 250 ml of saline. The filtrates were combined and ultrafiltered using a HIP10 hollow fiber (Amicon, 10,000Mw cut-off). The retentate was washed 4 times with 250 ml of saline. The retentate was then concentrated to >35mg of PRP/ml.

d. The retentate was analyzed for ribose by orcinol assay and reducing groups by alkaline ferricyanide assay. A small aliquot of the retentate was analyzed on a Biogel® P-100 column (7X25cm) using .15M saline as elutant and analyzing each of the fractions by orcinol and alkaline ferricyanide assay. The analysis showed that the retentate material was composed of oligosaccharides having a DP between 15 and 30 with a weight average DP of about 20.

For capsular polymer fragments prepared by oxidative cleavage chain length (DP) is defined as (ribose units/reducing groups) x 2.

Two batches of periodate oxidized PRP were fractionated as in part d and were characterized as follows:

SACCHARIDE CHAIN LENGTH				
Fraction No.	DP of Fraction		% of Total	
	BATCH #2	BATCH #3	BATCH #2	BATCH #3
14	36.5	41.0	12.7	5.9
15	24.1	32.5	11.0	9.4
16	25.3	24.5	13.2	11.8
17	25.4	22.8	14.4	14.3
18	23.2	20.2	13.6	14.6
19	20.2	19.0	11.9	14.2
20	20.4	17.7	9.3	12.4
21	16.1	16.0	6.7	10.0
22	11.7	12.3	7.2	7.1

### CRM-PRP Conjugation

a. CRM protein was dissolved in 0.2M sodium phosphate buffer (pH 7.0) at a final concentration of 10 mg/ml.

# EP 0 245 045 B1

- b. Lyophilized oligosaccharide was reconstituted in distilled water, an appropriate quantity (average DP of 20) was added to the CRM protein, and the solution was mixed.
- c. Sodium cyanoborohydride (0.5 g/ml) (10X molar excess) was added, and the solution was mixed and incubated at 37° C for 3 days.
- 5 d. Sodium borohydride solution (100X the reducing groups) was added, and the solution was allowed to stand at room temperature for 2 hours.
- e. The conjugate was diluted 10X with 6M urea to dissolve any precipitate, and the solution was ultrafiltered using an Amicon stirred cell with a YM-30 (30,000 Mw cut-off) membrane.
- 10 f. The solution was repeatedly ultrafiltered using sterile saline until the filtrate was negative for pentose and cyanide ion.

## Properties of the Final Conjugates

Table 1 presents various characteristics of the PRP-CRM<sub>197</sub> conjugates from various batches of oxidized PRP and lots resulting from several conjugation runs:

TABLE 1

PRODUCTS OF CRM-PRP CONJUGATION				
VACCINE LOT NO.	PRP SACCHARIDE BATCH	RATIO OF PRP/CRM IN REACTION MIXTURE (μg/μg)	RATIO OF PRP/CRM IN FINAL CONJUGATE (μg/μg)	Kd* (SEPHAROSE CL-4B)
5	#2	1.0	0.25	0.27
6	#2	2.0	0.62	0.31
7	#3	1.0	0.38	0.36
8	#3	2.0	0.57	0.44
9	#6	1.0	0.60	0.48
10	#6	2.0	0.42	0.48
11	#7	1.0	0.27	0.30
12	#7	2.0	0.42	0.48

\*Kd at which 50% of the material (protein) elutes.

## Bottling

- a. The CRM-PRP conjugate is sterile filtered through a 0.8 and then a 0.22 micron filter into a tared sterile container.
- b. A sample is removed aseptically and analyzed for protein by Lowry assay.
- c. The volume of filtered material is determined by weighing the container and a final volume calculated to give 50 μg of protein per ml.
- 45 d. An amount of 1% Thimerosal in sterile saline is added through a sterile 0.22 micron filter to give 0.01% Thimerosal in the final solution.
- e. The vaccine is brought to the final volume with sterile saline filtered through a 0.22 micron filter.
- f. The solution is mixed and 5.5 ml aliquoted into sterile, pyrogen-free 10 ml vials (Wheaton, type 1 glass), which are stopped (butyl gray rubber, Wheaton), sealed, and stored at 2-8° C.

FINAL DOSAGE FORMULATIONS*			
Vaccine Lot No.	Protein (µg/ml)	PRP (µg/ml)	Kd**
5	50	12.5	0.27
6	50	31.0	0.31
7	50	19.0	0.36
8	50	28.5	0.44
9	50	30.0	0.48
10	50	21.0	0.48
11	50	13.5	0.30
12	50	21.0	0.48

\* All formulations are made up in 0.9% NaCl and 0.01% Thimerosal.

\*\* Kd at which 50% of the material (protein) elutes.

#### Testing In Vitro Antigenicity

Serial dilutions of vaccine in PBS 0.05% Tween® were added in duplicate to wells of microtiter plates precoated with diphtheria toxoid. A pooled high-titered polyclonal human diphtheria antitoxin serum or a human polyclonal anti-PRP serum was then added to the wells and the plates incubated at 20°C for 24 hours. Antibody binding was determined by subsequent incubation of the wells with enzyme-labelled anti-human immunoglobulin followed by incubation for 60 minutes with the enzyme substrate and quantitation of the optical density. The results are presented in Table 2.

**TABLE 2**

#### In Vitro Antigenicity of PRP-CRM Conjugate

#### Inhibition of Binding of Human Polyclonal Anti-Diphtheria Toxoid and Anti-PRP Antibodies

VACCINE	EQUIVALENT OF INHIBITOR ON BINDING	
	ANTI-PRP	ANTI-DIP TOXOID
PRP	(1)	-
DT-Mass*	-	(1)
Lot #5	1.5	87.0
Lot #6	1.1	57.0
Lot #7	3.3	9.3
Lot #8	2.9	8.0

\* Diphtheria toxoid supplied by the Massachusetts Public Health Biologic Laboratories, lot Dcp 27.



The data in Table 2 indicate that the various lots of vaccine retain in vitro antigenicity: they can compete with polyclonal antibodies to PRP and to diphtheria toxoid. The data also indicate that the PRP antigen is relatively exposed while the diphtheria toxoid epitopes are less well and variably exposed.

#### 5 Immunogenicity in Animals

##### a. Rabbits

Table 3 summarizes three experiments in which young rabbits were vaccinated at week 0, 1, and 2 with 25 µg of vaccine. All vaccines were immunogenic and gave boostable anti-PRP responses as determined by ELISA assay. Moderate anti-PRP responses were seen even after a single injection of 25 µg of conjugate vaccine.

##### b. Mice

The results obtained with vaccination of young Swiss Webster mice again produced a boostable anti-PRP response (data not shown).

TABLE 3

ANTI-PRP RESPONSES IN WEANLING RABBITS TO VARIOUS LOTS OF PRP-CRM CONJUGATES			
VACCINE LOT NO.	WEEK 0 µg/ml (GMT)	WEEK 1 µg/ml (GMT)	WEEK 3 µg/ml (GMT)
5	0.1	0.23	7.56
6	0.1	0.38	2.86
7	0.2	0.86	9.70
8	0.1	0.87	7.61
9	0.1	0.36	3.88
10	0.1	0.92	1.84
11	0.1	0.21	5.01
12	0.1	0.31	2.33

#### Immunogenicity in Human infants

Infant subjects were healthy and had had no prior immunization with Hib vaccine nor history of serious adverse reaction to vaccines. Beginning at the ages noted in Table 4 (18, 7 and 2 mo., respectively), they were bled, given a 25 µg subcutaneous primary injection of PRP-CRM conjugate, observed at least 20 minutes and released to their parents for observation and recording of possible local and systemic adverse reactions.

For the 7-mo. and 2-mo. groups, after lapse of the times indicated in Table 4, the process was repeated for a secondary immunization with the same vaccine. After another lapse of time (see Table 4), they were again bled for determination of the secondary response.

As can be seen from Table 4, single injections were effective in raising antibodies in age groups 18 and 7 months, while in 2 month old infants a modest increase in antibody was observed (despite the expected decline in maternal IgG antibodies). In all of the infants, adequate levels of anti-PRP antibody were observed 1-2 months after a second immunization. The response observed in 6 month old infants after two immunizations was sufficient to elicit protective levels of antibodies.

TABLE 4

ANTI-PRP ANTIBODY RESPONSE to 25 µg VACCINE				
Age (mos.) at Vaccination	No. of Children	Antibody, µg/ml*		
		Pre	Post 1	Post 2
18-23	84	0.40 1 mo.	6.53	
7-15	88	0.15 1-2 mo.	4.54 1-2 mo.	18.9
2-6	30	0.17 2 mo.	0.25 2 mo.	1.23

\* Geometric Mean Titer.

**Claims**

Claims for the following Contracting States : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. An immunogenic conjugate, comprising: the reductive amination product of
  - (i) a capsular polymer fragment that has at least two carbonyl groups and that is derived from the capsular polymer of a bacterial pathogen, the capsular polymer fragment being obtained by a process which comprises treating said polymer with an acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidising agent, and
  - (ii) a bacterial toxin or toxoid,
 said conjugate comprising a cross-linked conjugate.
2. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the capsular polymer is immunogenic in mature humans and less immunogenic in infant humans.
3. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the reductive amination is performed in the presence of cyanoborohydride anions.
4. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the toxin or toxoid is diphtheria toxin or toxoid.
5. The immunogenic conjugate of claim 4, wherein the toxoid is CRM<sub>197</sub>.
6. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
7. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the toxin or toxoid is a pseudomonas toxin or toxoid.
8. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the toxin or toxoid is a staphylococcus toxin or toxoid.
9. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the toxin or toxoid is a streptococcus toxin or toxoid.
10. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the toxin or toxoid is pertussis toxin or toxoid.
11. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the toxin or toxoid is an Escherichia coli toxin or toxoid.
12. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Haemophilus influenzae type b.
13. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Escherichia coli.
14. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Neisseria meningitidis.
15. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Neisseria meningitidis serogroup A.

16. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Neisseria meningitidis serogroup C.
17. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Streptococcus pneumoniae.
18. The immunogenic conjugate of claim 1, wherein the bacterial pathogen is selected from the group consisting of Streptococcus pneumoniae serotypes 6, 12, 14, 19, 23 and 51.
19. The immunogenic conjugate of claim 5, wherein the bacterial pathogen is Haemophilus influenzae type b.
20. The immunogenic conjugate of claim 5, wherein the bacterial pathogen is selected from the group consisting of Streptococcus pneumoniae serotypes 6, 12, 14, 19, 23 and 51.
21. The immunogenic conjugate of any one of claims 1 to 20, wherein the oxidising agent is periodate.
22. The immunogenic conjugate of any one of claims 1 to 21, wherein the fragment is produced from a capsular polymer by first treating said polymer with acid, base or enzyme and then generating aldehyde groups by treatment with an oxidizing agent.
23. An immunogenic conjugate comprising the reductive amination product of a capsular polymer fragment having a chain length of from about 10 to about 30 monomeric units and at least two carbonyl groups, which fragment is derived from the capsular polymer of a bacterial pathogen that is Streptococcus pneumoniae or Haemophilus influenzae bacterium, the capsular polymer fragment being obtained by a process which comprises treating said polymer with an acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent, and a bacterial toxin or toxoid, said conjugate comprising a cross-linked conjugate.
24. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the capsular polymer is immunogenic in mature humans and less immunogenic in infant humans.
25. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the reductive amination is performed in the presence of cyanoborohydride anions
26. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the toxin or toxoid is diphtheria toxin or toxoid.
27. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the toxoid is CRM<sub>197</sub>.
28. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
29. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the toxin or toxoid is a pseudomonas toxin or toxoid.
30. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the toxin or toxoid is a staphylococcus toxin or toxoid.
31. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the toxin or toxoid is a streptococcus toxin or toxoid.
32. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the toxin or toxoid is pertussis toxin or toxoid.
33. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the toxin or toxoid is an Escherichia coli toxin or toxoid.
34. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the bacterial pathogen is Haemophilus influenzae type b.
35. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the bacterial pathogen is Streptococcus pneumoniae.
36. The immunogenic conjugate of claim 23, wherein the bacterial pathogen is selected from the group consisting of Streptococcus pneumoniae serotypes 6, 12, 14, 19, 23 and 51.

37. The immunogenic conjugate of claim 27, wherein the bacterial pathogen is Haemophilus influenzae type b.
38. The immunogenic conjugate of claim 27, wherein the bacterial pathogen is Streptococcus pneumoniae.
39. The immunogenic conjugate of claim 27, wherein the bacterial pathogen is selected from the group consisting of Streptococcus pneumoniae serotypes 6, 12, 14, 19, 23, and 51.
40. The immunogenic conjugate of any one of claims 23 to 39, wherein the oxidising agent is periodate.
41. The immunogenic conjugate of any one of claims 23 to 40, wherein the fragment is produced from a capsular polymer by first treating said polymer with acid, base or enzyme and then generating aldehyde groups by treatment with an oxidizing agent.
42. An immunogenic conjugate comprising: a formalin-treated reductive amination product of a capsular polymer fragment having at least two carbonyl groups and derived from the capsular polymer of a bacterial pathogen, the capsular polymer fragment being obtained by a process which comprises treating said polymer with an acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent, and a bacterial toxin or toxoid, said conjugate comprising a cross-linked conjugate.
43. An immunogenic conjugate comprising: a formalin-treated reductive amination product of a capsular polymer fragment having a chain length of from about 10 to about 30 monomeric units and at least two carbonyl groups, which fragment is derived from the capsular polymer of a Streptococcus pneumoniae or Haemophilus influenzae bacterium, the capsular polymer fragment being obtained by a process which comprises treating said polymer with an acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent, and a bacterial toxin or toxoid, said conjugate comprising a cross-linked conjugate.
44. The immunogenic conjugate of claim 42 or 43, wherein the bacterial toxoid is diphtheria toxoid.
45. The immunogenic conjugate of claim 42 or 43, wherein the toxoid is CRM<sub>197</sub>.
46. The immunogenic conjugate of claim 42 or 43, wherein the bacterial toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
47. A method for preparing an immunogenic conjugate, comprising: forming the reductive amination product of
  - (i) a capsular polymer fragment that has at least two carbonyl groups and that is derived from the capsular polymer of a bacterial pathogen, the capsular polymer fragment being obtained by a process which comprises treating said polymer with acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent, and
  - (ii) a bacterial toxin or toxoid,said reductive amination being performed in the presence of cyanoborohydride ions, and said conjugate comprising a cross-linked conjugate.
48. The method of claim 47, wherein the capsular polymer is immunogenic in mature humans and less immunogenic in infant humans.
49. The method of claim 47, wherein the toxin or toxoid is diphtheria toxin or toxoid.
50. The method of claim 47, wherein the toxin or toxoid is CRM<sub>197</sub>.
51. The method of claim 47, wherein the toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
52. The method of claim 47, wherein the toxin or toxoid is pseudomonas toxin or toxoid.
53. The method of claim 47, wherein the toxin or toxoid is staphylococcus toxin or toxoid.

54. The method of claim 47, wherein the toxin or toxoid is streptococcus toxin or toxoid.
55. The method of claim 47, wherein the toxin or toxoid is pertussis toxin or toxoid.
- 5 56. The method of claim 47, wherein the toxin or toxoid is an Escherichia coli toxin or toxoid.
57. The method of claim 47, wherein the pathogen is Haemophilus influenzae type b.
58. The method of claims 47, wherein the pathogen is Escherichia coli.
- 10 59. The method of claim 47, wherein the pathogen is Neisseria meningitidis.
60. The method of claim 47, wherein the pathogen is Streptococcus pneumoniae.
- 15 61. The method of claim 47, wherein the pathogen is Pseudomonas.
62. The method of claim 49, wherein the pathogen is Haemophilus influenzae b.
63. The method of claim 49, wherein the pathogen is Streptococcus pneumonia.
- 20 64. The method of any one of claims 47 to 63, wherein the oxidizing agent is periodate.
65. The method of any one of claims 47 to 64, wherein the fragment is produced from a capsular polymer by first treating said polymer with acid, base or enzyme and then generating aldehyde groups by treatment with an oxidizing agent.
- 25 66. The method of any one of claims 47 to 65, further comprising treating said reductive amination product with formalin.
- 30 67. The method of claim 66, wherein the bacterial toxoid is diphtheria toxoid.
68. The method of claim 66, wherein the toxoid is CRM<sub>197</sub>.
69. The method of claim 66, wherein the bacterial toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
- 35 70. A vaccine that elicits effective levels of anti-capsular polymer antibodies in humans, comprising: an immunogenic conjugate of any one of claims 1 to 46 and a pharmaceutically acceptable carrier.
71. A method for preparing a capsular polymer fragment that has at least two carbonyl groups and that is suitable for use in the production of a cross-linked immunogenic conjugate, which comprises treating a capsular polymer of a bacterial pathogen with acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent.
- 40

**Claims for the following Contracting States : AT, ES**

- 45 1. A method for preparing an immunogenic conjugate, comprising reacting
  - (i) a capsular polymer fragment that has at least two carbonyl groups and that is derived from the capsular polymer of a bacterial pathogen, the capsular polymer fragment being obtained by a process which comprises treating said polymer with an acid, base or enzyme and generating
  - 50 carbonyl groups by treatment with an oxidising agent, and
  - (ii) a bacterial toxin or toxoid,under reductive amination conditions, said conjugate comprising a cross-linked conjugate.
2. The method of claim 1, wherein the capsular polymer is immunogenic in mature humans and less
- 55 immunogenic in infant humans.
3. The method of claim 1, wherein the toxin or toxoid is diphtheria toxin or toxoid.

4. The method of claim 4, wherein the toxoid is CRM<sub>197</sub>.
5. The method of claim 1, wherein the toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
- 5 6. The method of claim 1, wherein the toxin or toxoid is a pseudomonas toxin or toxoid.
7. The method of claim 1, wherein the toxin or toxoid is a staphylococcus toxin or toxoid.
8. The method of claim 1, wherein the toxin or toxoid is a streptococcus toxin or toxoid.
- 10 9. The method of claim 1, wherein the toxin or toxoid is pertussis toxin or toxoid.
10. The method of claim 1, wherein the toxin or toxoid is an Escherichia coli toxin or toxoid.
- 15 11. The method of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Haemophilus influenzae type b.
12. The method of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Escherichia coli.
13. The method of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Neisseria meningitidis.
- 20 14. The method of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Neisseria meningitidis serogroup A.
15. The method of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Neisseria meningitidis serogroup C.
- 25 16. The method of claim 1, wherein the bacterial pathogen is Streptococcus pneumoniae.
17. The method of claim 1, wherein the bacterial pathogen is selected from the group consisting of Streptococcus pneumoniae serotypes 6, 12, 14, 19, 23 and 51.
- 30 18. The method of claim 4, wherein the bacterial pathogen is Haemophilus influenzae type b.
19. The method of claim 4, wherein the bacterial pathogen is selected from the group consisting of Streptococcus pneumoniae serotypes 6, 12, 14, 19, 23 and 51.
- 35 20. The method of any one of claims 1 to 19, wherein the oxidising agent is periodate.
21. The method of any one of claims 1 to 20, wherein the fragment is produced from a capsular polymer by first treating said polymer with acid, base or enzyme and then generating aldehyde groups by treatment with an oxidizing agent.
- 40 22. A method for preparing an immunogenic conjugate comprising reacting
  - (i) a capsular polymer fragment having a chain length of from about 10 to about 30 monomeric units and at least two carbonyl groups, which fragment is derived from the capsular polymer of a bacterial pathogen that is Streptococcus pneumoniae or Haemophilus influenzae bacterium, the capsular polymer fragment being obtained by a process which comprises treating said polymer with an acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent, and
  - 45 (ii) a bacterial toxin or toxoid,under reductive amination conditions, said conjugate comprising a cross-linked conjugate.
- 50 23. The method of claim 22, wherein the capsular polymer is immunogenic in mature humans and less immunogenic in infant humans.
24. The method of claim 22, wherein the reductive amination is performed in the presence of cyanoborohydride anions
- 55 25. The method of claim 22, wherein the toxin or toxoid is diphtheria toxin or toxoid.
26. The method of claim 22, wherein the toxoid is CRM<sub>197</sub>.

27. The method of claim 22, wherein the toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
28. The method of claim 22, wherein the toxin or toxoid is a pseudomonas toxin or toxoid.
- 5 29. The method of claim 22, wherein the toxin or toxoid is a staphylococcus toxin or toxoid.
30. The method of claim 22, wherein the toxin or toxoid is a streptococcus toxin or toxoid.
31. The method of claim 22, wherein the toxin or toxoid is pertussis toxin or toxoid.
- 10 32. The method of claim 22, wherein the toxin or toxoid is an Escherichia coli toxin or toxoid.
33. The method of claim 22, wherein the bacterial pathogen is Haemophilus influenzae type b.
- 15 34. The method of claim 22, wherein the bacterial pathogen is Streptococcus pneumoniae.
35. The method of claim 22, wherein the bacterial pathogen is selected from the group consisting of Streptococcus pneumoniae serotypes 6, 12, 14, 19, 23 and 51.
- 20 36. The method of claim 26, wherein the bacterial pathogen is Haemophilus influenzae type b.
37. The method of claim 26, wherein the bacterial pathogen is Streptococcus pneumoniae.
38. The method of claim 26, wherein the bacterial pathogen is selected from the group consisting of  
25 Streptococcus pneumoniae serotypes 6, 12, 14, 19, 23 and 51.
39. The method of any one of claims 22 to 38, wherein the oxidising agent is periodate.
40. The method of any one of claims 22 to 39, wherein the fragment is produced from a capsular polymer  
30 by first treating said polymer with acid, base or enzyme and then generating aldehyde groups by treatment with an oxidizing agent.
41. A method for preparing an immunogenic conjugate comprising treating the reductive amination product  
35 of a capsular polymer fragment having at least two carbonyl groups and derived from the capsular polymer of a bacterial pathogen, the capsular polymer fragment being obtained by a process which comprises treating said polymer with an acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent, and a bacterial toxin or toxoid, said conjugate comprising a cross-linked conjugate, with formalin.
- 40 42. A method for preparing an immunogenic conjugate comprising treating the reductive amination product of a capsular polymer fragment having a chain length of from about 10 to about 30 monomeric units and at least two carbonyl groups, which fragment is derived from the capsular polymer of a Streptococcus pneumoniae or Haemophilus influenzae bacterium, the capsular polymer fragment being  
45 obtained by a process which comprises treating said polymer with an acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent, and a bacterial toxin or toxoid, said conjugate comprising a cross-linked conjugate, with formalin.
43. The method of claim 41 or 42, wherein the bacterial toxoid is diphtheria toxoid.
- 50 44. The method of claim 41 or 42, wherein the toxoid is CRM<sub>197</sub>.
45. The method of claim 41 or 42, wherein the bacterial toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
46. A method for preparing an immunogenic conjugate, comprising reacting  
55 (i) a capsular polymer fragment that has at least two carbonyl groups and that is derived from the capsular polymer of a bacterial pathogen, the capsular polymer fragment being obtained by a process which comprises treating said polymer with acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent, and

(ii) a bacterial toxin or toxoid,  
under reductive amination conditions, said reductive amination being performed in the presence of  
cyanoborohydride ions, and said conjugate comprising a cross-linked conjugate.

- 5 47. The method of claim 46, wherein the capsular polymer is immunogenic in mature humans and less immunogenic in infant humans.
48. The method of claim 46, wherein the toxin or toxoid is diphtheria toxin or toxoid.
- 10 49. The method of claim 46, wherein the toxin or toxoid is CRM<sub>197</sub>.
50. The method of claim 46, wherein the toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
51. The method of claim 46, wherein the toxin or toxoid is pseudomonas toxin or toxoid.
- 15 52. The method of claim 46, wherein the toxin or toxoid is staphylococcus toxin or toxoid.
53. The method of claim 46, wherein the toxin or toxoid is streptococcus toxin or toxoid.
- 20 54. The method of claim 46, wherein the toxin or toxoid is pertussis toxin or toxoid.
55. The method of claim 46, wherein the toxin or toxoid is an Escherichia coli toxin or toxoid.
56. The method of claim 46, wherein the pathogen is Haemophilus influenzae type b.
- 25 57. The method of claims 46, wherein the pathogen is Escherichia coli.
58. The method of claim 46, wherein the pathogen is Neisseria meningitidis.
- 30 59. The method of claim 46, wherein the pathogen is Streptococcus pneumoniae.
60. The method of claim 46, wherein the pathogen is Pseudomonas.
61. The method of claim 48, wherein the pathogen is Haemophilus influenzae b.
- 35 62. The method of claim 48, wherein the pathogen is Streptococcus pneumonia.
63. The method of any one of claims 46 to 62, wherein the oxidizing agent is periodate.
- 40 64. The method of any one of claims 46 to 63, wherein the fragment is produced from a capsular polymer by first treating said polymer with acid, base or enzyme and then generating aldehyde groups by treatment with an oxidizing agent.
65. The method of any one of claims 46 to 64, further comprising treating said reductive amination product  
45 with formalin.
66. The method of claim 65, wherein the bacterial toxoid is diphtheria toxoid.
67. The method of claim 65, wherein the toxoid is CRM<sub>197</sub>.
- 50 68. The method of claim 65, wherein the bacterial toxin or toxoid is tetanus toxin or toxoid.
69. A method for producing a vaccine that elicits effective levels of anti-capsular polymer antibodies in humans, comprising: preparing an immunogenic conjugate according to a method as claimed in any  
55 one of claims 1 to 69 and then formulating the resulting conjugate and a pharmaceutically acceptable carrier into a vaccine.



70. A method for preparing a capsular polymer fragment that has at least two carbonyl groups and that is suitable for use in the production of a cross-linked immunogenic conjugate, which comprises treating a capsular polymer of a bacterial pathogen with acid, base or enzyme and generating carbonyl groups by treatment with an oxidizing agent.

# Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Immunogen-Konjugat, umfassend: das reduktive Aminiervngsprodukt
  - (i) eines Kapsel-Polymerfragments, das mindestens Zwei Carbonylgruppen aufweist und sich ableitet von dem Kapsel-Polymeren eines bakteriellen Pathogens, wobei das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen der Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel, und
  - (ii) eines Bakterien-Toxins oder -Toxoids, wobei das genannte Konjugat ein vernetztes Konjugat umfaßt.
2. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Kapsel-Polymere bei immunologisch reifen Menschen immunogen und bei immunologisch unreifen Säuglingen und Kleinkindern weniger immunogen wirkt.
3. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem die reduktive Aminierung durchgeführt wird in Gegenwart von Cyanoborhydrid-Anionen.
4. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid das Diphtherie-Toxin oder -Toxoid darstellt.
5. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 4, bei dem das Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
6. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
7. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Pseudomonas-Toxin oder -Toxoid ist.
8. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Staphylococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
9. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Streptococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
10. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid das Keuchhusten-Toxin oder -Toxoid ist.
11. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Escherichia coli-Toxin oder -Toxoid ist.
12. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Haemophilus influenzae von Typ B darstellt.
13. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Escherichia coli ist.
14. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Neisseria meningitidis ist.
15. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Neisseria meningitidis der Serogruppe A ist.

16. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Neisseria meningitidis der Serogruppe C ist.
- 5 17. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Streptococcus pneumoniae ist.
18. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus den Streptococcus pneumoniae Serotypen, 6, 12, 14, 19, 23, und 51.
- 10 19. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 5, bei dem das Bakterien-Pathogen Haemophilus influenzae vom Typ B ist.
20. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 5, bei dem das Bakterien-Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus den Streptococcus pneumoniae Serotypen 6, 12, 14, 19, 23 und 51.
- 15 21. Immunogen-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20, bei dem das Oxidationsmittel Periodat ist.
22. Immunogen-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 21, bei dem das Fragment hergestellt wird aus einem Kapsel-Polymeren, indem zuerst das genannte Polymere mit Säure, Base oder einem Enzym behandelt und dann Aldehydgruppen erzeugt werden durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel.
- 20 23. Immunogen-Konjugat, umfassend das Produkt der reduktiven Aminierung eines Kapsel-Polymerfragments, das eine Länge aufweist von etwa 10 bis etwa 30 Monomer-Einheiten und mindestens zwei Carbonylgruppen besitzt, wobei das Fragment sich ableitet von dem Kapsel-Polymeren eines Bakterien-Pathogens, das das Streptococcus pneumoniae- oder Haemophilus influenzae-Bakterium darstellt, wobei das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen der Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel, und ein Bakterien-Toxin oder -Toxoid, wobei das Konjugat ein vernetztes Konjugat umfaßt.
- 25 24. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Kapsel-Polymere bei immunologisch reifen Menschen immunogen und bei immunologisch unreifen Säuglingen und Kleinkindern weniger immunogen wirkt.
- 30 25. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem die reduktive Aminierung durchgeführt wird in Gegenwart von Cyanoborhydrid-Anionen.
- 35 26. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Toxin oder Toxoid das Diphtherie-Toxin oder -Toxoid ist.
- 40 27. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
28. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Toxin oder Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
- 45 29. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Pseudomonas-Toxin oder -Toxoid ist.
30. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Staphylococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
- 50 31. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Streptococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
- 55 32. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Toxin oder Toxoid das Keuchhusten-Toxin oder -Toxoid ist.

33. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Escherichia coli-Toxin oder -Toxoid ist.
- 5 34. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Bakterien-Pathogen Haemophilus influenzae vom Typ B ist.
35. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Bakterien-Pathogen Streptococcus Pneumoniae ist.
- 10 36. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 23, bei dem das Bakterien-Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus den Streptococcus pneumoniae-Serotypen 6, 12, 14, 19, 23 und 51.
37. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 27, bei dem das Bakterien-Pathogen Haemophilus influenzae von Typ B ist.
- 15 38. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 27, bei dem das Bakterien-Pathogen Streptococcus pneumoniae ist.
39. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 27, bei dem das Bakterien-Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus den Streptococcus pneumoniae Serotypen 6, 12, 14, 19, 23 und 51.
- 20 40. Immunogen-Konjugat nach einem der Ansprüche 23 bis 39, bei dem das Oxidationsmittel Periodat ist.
41. Immunogen-Konjugat nach einem der Ansprüche 23 bis 40, bei dem das Fragment hergestellt wird aus einem Kapsel-Polymeren, indem das genannte Polymere zuerst mit Säure, Base oder einem Enzym behandelt wird und dann Aldehydgruppen erzeugt werden durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel.
- 25 42. Immunogen-Konjugat, umfassend: ein Formalin-behandeltes Produkt einer reduktiven Aminierung eines Kapsel-Polymerfragments, das mindestens zwei Carbonylgruppen besitzt und sich ableitet von dem Kapsel-Polymeren eines Bakterien-Pathogens, wobei das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen der Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel, und ein bakterielles Toxin oder Toxoid, wobei das genannte Konjugat ein vernetztes Konjugat umfaßt.
- 30 43. Immunogen-Konjugat, umfassend: ein Formalin-behandeltes Produkt einer reduktiven Aminierung eines Kapsel-Polymerfragments, welches eine Kettenlänge besitzt von etwa 10 bis etwa 30 Monomer-Einheiten und mindestens zwei Carbonylgruppen aufweist, wobei das Fragment sich ableitet von dem Kapsel-Polymeren eines Streptococcus pneumoniae- oder Haemophilus influenzae-Bakteriums, das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen der Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel, und ein Bakterien-Toxin oder -Toxoid, wobei das genannte Konjugat ein vernetztes Konjugat umfaßt.
- 40 44. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 42 oder 43, bei dem das Bakterientoxoid das Diphtherie-Toxoid ist.
- 45 45. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 42 oder 43, bei dem das Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
46. Immunogen-Konjugat nach Anspruch 42 oder 43, bei dem das Bakterien-Toxin oder -Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
- 50 47. Verfahren zur Herstellung eines Immunogen-Konjugats, umfassend: Bilden des Produkts der reduktiven Aminierung aus
  - (i) einem Kapsel-Polymerfragment, das mindestens zwei Carbonylgruppen aufweist und sich ableitet von dem Kapsel-Polymeren eines Bakterien-Pathogens, wobei das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen der Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel und
- 55

(ii) einem Bakterien-Toxin oder -Toxoid, wobei die genannte reduktive Aminierung durchgeführt wird in Gegenwart von Cyanoborhydrid-Ionen und das genannte Konjugat ein vernetztes Konjugat umfaßt.

48. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Kapsel-Polymere bei immunologisch reifen Menschen immunogen und bei immunologisch unreifen Säuglingen und Kleinkindern weniger immunogen wirkt.
49. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Toxin oder Toxoid das Diphtherie-Toxin oder -Toxoid ist.
50. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Toxin oder Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
51. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Toxin oder Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
52. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Pseudomonas-Toxin oder -Toxoid ist.
53. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Staphylococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
54. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Streptococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
55. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Toxin oder Toxoid das Keuchhusten-Toxin oder -Toxoid ist.
56. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Escherichia coli-Toxin oder -Toxoid ist.
57. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Pathogen Haemophilus influenzae vom Typ B ist.
58. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Pathogen Escherichia coli ist.
59. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Pathogen Neisseria meningitidis ist.
60. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Pathogen Streptococcus pneumoniae ist.
61. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Pathogen Pseudomonas ist.
62. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Pathogen Haemophilus influenzae b ist.
63. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem das Pathogen Streptococcus pneumoniae ist.
64. Verfahren nach einem der Ansprüche 47 bis 63, bei dem das Oxidationsmittel Periodat ist.
65. Verfahren nach einem der Ansprüche 47 bis 64, bei dem das Fragment hergestellt wird aus einem Kapsel-Polymeren, indem das genannte Polymere zuerst mit Säure, Base oder einem Enzym behandelt wird und dann Aldehydgruppen erzeugt werden durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel.
66. Verfahren nach einem der Ansprüche 47 bis 65, welches weiterhin umfaßt Behandeln des genannten reduktiven Aminierungsprodukts mit Formalin.
67. Verfahren nach Anspruch 66, bei dem das Bakterien-Toxoid das Diphtherie-Toxoid ist.
68. Verfahren nach Anspruch 66, bei dem das Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
69. Verfahren nach Anspruch 66, bei dem das Bakterien-Toxin oder -Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
70. Impfstoff, der bei Menschen wirksame Konzentrationen von Antikörpern gegen das Kapsel-Polymere erzeugt, welcher umfaßt ein Immunogen-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 46 und einen pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff.

71. Verfahren zur Herstellung eines Kapsel-Polymerfragments, das mindestens zwei Carbonylgruppen aufweist und das geeignet ist zur Verwendung bei der Herstellung eines vernetzten Immunogen-Konjugats, welches umfaßt Behandeln eines Kapsel-Polymeren eines Bakterien-Pathogens mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen von Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel.

**Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, ES**

1. Verfahren zur Herstellung eines Immunogen-Konjugats, umfassend Umsetzen
  - (i) eines Kapsel-Polymerfragments, das mindestens zwei Carbonylgruppen aufweist und sich ableitet von dem Kapsel-Polymeren eines Bakterien-Pathogens, wobei das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen der Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel, und
  - (ii) eines Bakterien-Toxins oder -Toxoids unter reduktiven Aminierungsbedingungen, wobei das Konjugat ein vernetztes Konjugat umfaßt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Kapsel-Polymere bei immunologisch reifen Menschen immunogen und bei immunologisch unreifen Säuglingen und Kleinkindern weniger immunogen wirkt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid das Diphtherie-Toxin oder -Toxoid ist.
4. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem das Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Pseudomonas-Toxin oder -Toxoid ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Staphylococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
8. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Streptococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Toxin oder Toxoid das Keuchhusten-Toxin oder -Toxoid ist.
10. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem Toxin oder Toxoid ein Escherichia coli-Toxin oder Toxoid ist.
11. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Haemophilus influenzae vom Typ b ist.
12. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Escherichia coli ist.
13. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Neisseria meningitidis ist.
14. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Neisseria meningitidis der Serogruppe A ist.
15. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Neisseria meningitidis der Serogruppe C ist.
16. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen Streptococcus pneumoniae ist.
17. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Bakterien-Pathogen ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus den Streptococcus pneumoniae-Serotypen 6, 12, 14, 19, 23 und 51.
18. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem das Bakterien-Pathogen Haemophilus influenzae vom Typ b ist.
19. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem das Bakterien-Pathogen ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus den Streptococcus pneumoniae-Serotypen, 6, 12, 14, 19, 23 und 51.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, bei dem das Oxidationsmittel Periodat ist.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, bei dem Fragment hergestellt wird aus einem Kapsel-Polymeren, indem das genannte Polymere zuerst mit Säure, Base oder einem Enzym behandelt wird und dann Aldehydgruppen erzeugt werden durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel.
22. Verfahren zur Herstellung eines Immunogen-Konjugats, umfassend die Umsetzung
  - (i) eines Kapsel-Polymerfragments mit einer Kettenlänge von etwa 10 bis etwa 30 Monomer-Einheiten und mindestens zwei Carbonylgruppen, wobei das Fragment sich ableitet aus dem Kapsel-Polymeren eines Bakterien-Pathogens, welches das Streptococcus pneumoniae- oder Haemophilus influenzae-Bakterium ist, wobei das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen der Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel und
  - (ii) eines Bakterien-Toxins oder -Toxoid unter reduktiven Aminierungsbedingungen, wobei das genannte Konjugat ein vernetztes Konjugat umfaßt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Kapsel-Polymere bei immunologisch reifen Menschen immunogen und bei immunologisch unreifen Säuglingen und Kleinkindern weniger immunogen ist.
24. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem die reduktive Aminierung durchgeführt wird in Gegenwart von Cyanoborhydrid-Anionen.
25. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Toxin oder Toxoid das Diphtherie-Toxin oder Toxoid ist.
26. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
27. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Toxin oder Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
28. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Pseudomonas-Toxin oder -Toxoid ist.
29. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Staphylococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
30. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Streptococcus-Toxin oder Toxoid ist.
31. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Toxin oder Toxoid das Keuchhusten-Toxin oder -Toxoid ist.
32. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Escherichia coli-Toxin oder -Toxoid ist.
33. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Bakterien-Pathogen Haemophilus influenzae vom Typ b ist.
34. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Bakterien-Pathogen Streptococcus pneumoniae ist.
35. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Bakterien-Pathogen ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus den Streptococcus pneumoniae-Serotypen 6, 12, 14, 19, 23, und 51.
36. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem das Bakterien-Pathogen Haemophilus influenzae vom Typ b ist.
37. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem das Bakterien-Pathogen Streptococcus pneumoniae ist.
38. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem das Bakterien-Pathogen ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus den Streptococcus pneumoniae Serotypen 6, 12, 14, 19, 23 und 51.
39. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 38, bei dem das Oxidationsmittel Periodat ist.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 39, bei dem das Fragment hergestellt wird aus einem Kapsel-Polymeren, indem das genannte Polymere zuerst mit Säure, Base oder einem Enzym behan-

delt wird und dann Aldehydgruppen erzeugt werden durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel.

41. Verfahren zur Herstellung eines Immunogen-Konjugats, umfassend Behandeln des reduktiven Aminierungsprodukts eines Kapsel-Polymerfragments, das mindestens zwei Carbonylgruppen aufweist und sich ableitet von dem Kapsel-Polymeren eines Bakterien-Pathogens, wobei das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen der Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel und eines Bakterien-Toxins oder -Toxoids, wobei das Konjugat ein mit Formalin vernetztes Konjugat umfaßt.
42. Verfahren zur Herstellung eines Immunogen-Konjugats, umfassend Behandeln des reduktiven Aminierungsprodukts eines Kapsel-Polymerfragments, das eine Kettenlänge von etwa 10 bis etwa 30 Monomer-Einheiten und mindestens zwei Carbonylgruppen aufweist, wobei das Fragment sich ableitet von dem Kapsel-Polymeren eines Streptococcus pneumoniae- oder Haemophilus influenzae-Bakteriums, das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym, und Erzeugen von Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel, und eines Bakterien-Toxins oder -Toxoids, wobei das genannte Konjugat umfaßt ein mit Formalin vernetztes Konjugat.
43. Verfahren nach Anspruch 41 oder 42, bei dem das Bakterien-Toxoid das Diphtherie-Toxoid ist.
44. Verfahren nach Anspruch 41 oder 42, bei dem das Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
45. Verfahren nach Anspruch 41 oder 42, bei dem das Bakterien-Toxin oder -Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
46. Verfahren zur Herstellung eines Immunogen-Konjugats, umfassend Umsetzen
  - (i) eines Kapsel-Polymerfragments, das mindestens zwei Carbonylgruppen aufweist und sich ableitet von dem Kapsel-Polymeren eines Bakterien-Pathogens, wobei das Kapsel-Polymerfragment erhalten wird durch ein Verfahren, welches umfaßt Behandeln des genannten Polymeren mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen von Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel und
  - (ii) eines Bakterien-Toxins oder -Toxoids unter reduktiven Aminierungsbedingungen, wobei die genannte Aminierung in Gegenwart von Cyanoborhydrid-Ionen durchgeführt wird, und das genannte Konjugat ein vernetztes Konjugat umfaßt.
47. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Kapsel-Polymere bei immunologisch reifen Menschen immunogen und bei immunologisch unreifen Säuglingen und Kleinkindern weniger immunogen wirkt.
48. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Toxin oder Toxoid das Diphtherie-Toxin oder -Toxoid ist.
49. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Toxin oder Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
50. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Toxin oder Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
51. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Pseudomonas-Toxin oder -Toxoid ist.
52. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Staphylococcus-Toxin oder Toxoid ist.
53. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Streptococcus-Toxin oder -Toxoid ist.
54. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Toxin oder Toxoid das Keuchhusten-Toxin oder -Toxoid ist.
55. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Toxin oder Toxoid ein Escherichia coli-Toxin oder -Toxoid ist.
56. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Pathogen Haemophilus influenzae vom Typ b ist.

57. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Pathogen Escherichia coli ist.
58. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Pathogen Neisseria meningitidis ist.
- 5 59. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Pathogen Streptococcus pneumoniae ist.
60. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem das Pathogen Pseudomonas ist.
61. Verfahren nach Anspruch 48, bei dem das Pathogen Haemophilus influenzae b ist.
- 10 62. Verfahren nach Anspruch 48, bei dem das Pathogen Streptococcus pneumoniae ist.
63. Verfahren nach einem der Ansprüche 46 bis 62, bei dem das Oxidationsmittel Periodat ist.
- 15 64. Verfahren nach einem der Ansprüche 46 bis 63, bei dem das Fragment hergestellt wird aus einem Kapsel-Polymeren, indem das genannte Polymere zuerst mit Säure, Base oder einem Enzym behandelt wird und dann Aldehydgruppen erzeugt werden durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel.
- 20 65. Verfahren nach einem der Ansprüche 46 bis 64, welches weiter umfaßt Behandeln des genannten reduktiven Aminierungsprodukts mit Formalin.
66. Verfahren nach Anspruch 65, bei dem das Bakterien-Toxoid das Diphtherie-Toxoid ist.
67. Verfahren nach Anspruch 65, bei dem das Toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
- 25 68. Verfahren nach Anspruch 65, bei dem das Bakterien-Toxin oder -Toxoid das Tetanus-Toxin oder -Toxoid ist.
69. Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffs, der beim Menschen wirksame Konzentrationen von Antikörpern gegen das Kapsel-Polymere erzeugt, umfassend: Herstellen eines Immunogen-Konjugats gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 69 und dann Formulieren des resultierenden Konjugats und eines pharmazeutisch verträglichen Trägerstoffs zu einem Impfstoff.
- 30 70. Verfahren zur Herstellung eines Kapsel-Polymerfragments, das mindestens zwei Carbonylgruppen aufweist und geeignet ist zur Verwendung bei der Herstellung eines vernetzten Immunogen-Konjugats, welches umfaßt Behandeln eines Kapsel-Polymeren eines Bakterien-Pathogens mit Säure, Base oder einem Enzym und Erzeugen von Carbonylgruppen durch Behandeln mit einem Oxidationsmittel.
- 35

#### Revendications

40 **Revendications pour les Etats contractants suivants : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE**

1. Conjugué immunogène comprenant : le produit de l'amination par réduction de
  - (i) un fragment de polymère capsulaire qui a au moins deux groupes carbonyle et qui dérive du polymère capsulaire d'une bactérie pathogène, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu  
45 selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et
  - (ii) une toxine ou anatoxine bactérienne,ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé.
- 50 2. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel le polymère capsulaire est immunogène chez l'homme mature et moins immunogène chez le nourrisson.
3. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel l'amination par réduction est effectuée en présence d'anions cyanoborohydrure
- 55 4. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine diphtérique.



5. Conjugué immunogène selon la revendication 4, dans lequel l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.
6. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
- 5 7. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pseudomonas.
8. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou  
10 une anatoxine de staphylococcus.
9. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de streptococcus.
- 15 10. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pertussis.
11. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de Escherichia coli.
- 20 12. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Haemophilus influenzae type b.
13. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Escherichia coli.
- 25 14. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Neisseria meningitidis.
15. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Neisseria meningitidis séro groupe A.
- 30 16. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Neisseria meningitidis séro groupe C.
- 35 17. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Streptococcus pneumoniae.
18. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est choisie dans le groupe constitué par Streptococcus pneumoniae sérotypes 6, 12, 14, 19, 23 et 51.
- 40 19. Conjugué immunogène selon la revendication 5, dans lequel la bactérie pathogène est Haemophilus influenzae type b.
20. Conjugué immunogène selon la revendication 5, dans lequel la bactérie pathogène est choisie dans le  
45 groupe constitué par Streptococcus pneumoniae sérotypes 6, 12, 14, 19, 23 et 51.
21. Conjugué immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, où l'agent oxydant est un periodate.
- 50 22. Conjugué immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, où le fragment est produit à partir d'un polymère capsulaire, d'abord par traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme, puis formation de groupes aldéhyde par traitement avec un agent oxydant.
23. Conjugué immunogène comprenant le produit de l'amination par réduction d'un fragment de polymère  
55 capsulaire, ayant une longueur de la chaîne d'environ 10 à environ 30 motifs monomères et au moins deux groupes carbonyle, lequel fragment est dérivé du polymère capsulaire d'une bactérie pathogène qui est une bactérie Streptococcus pneumoniae ou Haemophilus influenzae, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide,

une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et d'une toxine ou d'une anatoxine bactérienne, ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé.

24. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel le polymère capsulaire est immunogène chez l'homme adulte et moins immunogène chez le nourrisson.
25. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel l'amination par réduction est effectuée en présence d'anions cyanoborohydrure.
26. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine diphtérique.
27. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.
28. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
29. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pseudomonas.
30. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de staphylococcus.
31. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de streptococcus.
32. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pertussis.
33. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de Escherichia coli.
34. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la bactérie pathogène est Haemophilus influenzae type b.
35. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la bactérie pathogène est Streptococcus pneumoniae.
36. Conjugué immunogène selon la revendication 23, dans lequel la bactérie pathogène est choisie dans le groupe constitué par Streptococcus pneumoniae sérotypes 6, 12, 14, 19, 23 et 51.
37. Conjugué immunogène selon la revendication 27, dans lequel la bactérie pathogène est Haemophilus influenzae type b.
38. Conjugué immunogène selon la revendication 27, dans lequel la bactérie pathogène est Streptococcus pneumoniae.
39. Conjugué immunogène selon la revendication 27, dans lequel la bactérie pathogène est choisie dans le groupe constitué par Streptococcus pneumoniae sérotypes 6, 12, 14, 19, 23 et 51.
40. Conjugué immunogène selon l'une quelconque des revendications 23 à 39, dans lequel l'agent oxydant est un periodate.
41. Conjugué immunogène selon l'une quelconque des revendications 23 à 40, dans lequel le fragment est produit à partir d'un polymère capsulaire, d'abord par traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme, puis formation de groupes aldéhyde par traitement avec un agent oxydant.

42. Conjugué immunogène comprenant : le produit, traité par la formaline, de l'amination réductrice d'un fragment de polymère capsulaire, ayant au moins deux groupes carbonyle et dérivé du polymère capsulaire d'une bactérie pathogène, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et d'une toxine ou d'une anatoxine bactérienne, ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé.
43. Conjugué immunogène comprenant : un produit, traité par la formaline, de l'amination réductrice d'un fragment de polymère capsulaire, ayant une longueur de la chaîne d'environ 10 à environ 30 motifs monomères et au moins deux groupes carbonyle, lequel fragment est dérivé du polymère capsulaire d'une bactérie Streptococcus pneumoniae ou Haemophilus influenzae, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et d'une toxine ou d'une anatoxine bactériennes, ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé.
44. Conjugué immunogène selon la revendication 42 ou 43, dans lequel l'anatoxine bactérienne est l'anatoxine diphtérique.
45. Conjugué immunogène selon la revendication 42 ou 43, dans lequel l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.
46. Conjugué immunogène selon la revendication 42 ou 43, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
47. Procédé pour préparer un conjugué immunogène comprenant : la formation du produit d'amination par réduction de
  - (i) un fragment de polymère capsulaire qui a au moins deux groupes carbonyle et qui est dérivé du polymère capsulaire d'une bactérie pathogène, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et
  - (ii) une toxine ou anatoxine bactériennes, ladite amination par réduction étant effectuée en présence d'ions cyanoborohydrure et ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé.
48. Procédé selon la revendication 47, dans lequel le polymère capsulaire est immunogène chez l'homme mature et moins immunogène chez le nourrisson.
49. Procédé selon la revendication 47, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine diphtérique.
50. Procédé selon la revendication 47, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.
51. Procédé selon la revendication 47, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
52. Procédé selon la revendication 47, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pseudomonas.
53. Procédé selon la revendication 47, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de staphylococcus.
54. Procédé selon la revendication 47, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de streptococcus.
55. Procédé selon la revendication 47, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pertussis.
56. Procédé selon la revendication 47, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de Escherichia coli.

57. Procédé selon la revendication 47, dans lequel l'agent pathogène est Haemophilus influenzae type b.
58. Procédé selon la revendication 47, dans lequel l'agent pathogène est Escherichia coli.
59. Procédé selon la revendication 47, dans lequel l'agent pathogène est Neisseria meningitidis.
60. Procédé selon la revendication 47, dans lequel l'agent pathogène est Streptococcus pneumoniae.
61. Procédé selon la revendication 47, dans lequel l'agent pathogène est Pseudomonas.
62. Procédé selon la revendication 49, dans lequel l'agent pathogène est Haemophilus influenzae b.
63. Procédé selon la revendication 49, dans lequel l'agent pathogène est Streptococcus pneumoniae.
64. Procédé selon l'une quelconque des revendications 47 à 63, dans lequel l'agent oxydant est un periodate.
65. Procédé selon l'une quelconque des revendications 47 à 64, dans lequel le fragment est produit à partir d'un polymère capsulaire, d'abord par traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme, puis formation de groupes aldéhyde par traitement avec un agent oxydant.
66. Procédé selon l'une quelconque des revendications 47 à 65, comprenant de plus le traitement avec la formoline dudit produit d'amination par réduction.
67. Procédé selon la revendication 66, dans lequel l'anatoxine bactérienne est l'anatoxine diphtérique.
68. Procédé selon la revendication 66, dans lequel l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.
69. Procédé selon la revendication 66, dans lequel la toxine ou l'anatoxine bactérienne est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
70. Vaccin qui provoque des taux efficaces d'anticorps anti-polymère capsulaire chez l'homme, comprenant : un conjugué immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 46 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
71. Procédé pour préparer un fragment de polymère capsulaire qui a au moins deux groupes carbonyle et qui convient à l'utilisation dans la production d'un conjugué immunogène réticulé, qui comprend le traitement d'un polymère capsulaire d'une bactérie pathogène avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant.

#### Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, ES

1. Procédé pour préparer un conjugué immunogène comprenant : la réaction de
  - (i) un fragment de polymère capsulaire qui a au moins deux groupes carbonyle et qui dérive du polymère capsulaire d'une bactérie pathogène, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et
  - (ii) une toxine ou anatoxine bactérienne,dans des conditions d'amination par réduction, ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le polymère capsulaire est immunogène chez l'homme mature et moins immunogène chez le nourrisson.
3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine diphtérique.
4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.

5. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
6. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pseudomonas.
7. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de staphylococcus.
8. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de streptococcus.
9. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pertussis.
10. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de Escherichia coli.
11. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Haemophilus influenzae type b.
12. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Escherichia coli.
13. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Neisseria meningitidis.
14. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Neisseria meningitidis séro groupe A.
15. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Neisseria meningitidis séro groupe C.
16. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est Streptococcus pneumoniae.
17. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la bactérie pathogène est choisie dans le groupe constitué par Streptococcus pneumoniae sérotypes 6, 12, 14, 19, 23 et 51.
18. Procédé selon la revendication 4, dans lequel la bactérie pathogène est Haemophilus influenzae type b.
19. Procédé selon la revendication 4, dans lequel la bactérie pathogène est choisie dans le groupe constitué par Streptococcus pneumoniae sérotypes 6, 12, 14, 19, 23 et 51.
20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, où l'agent oxydant est un periodate.
21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, où le fragment est produit à partir d'un polymère capsulaire, d'abord par traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme, puis formation de groupes aldéhyde par traitement avec un agent oxydant.
22. Procédé pour préparer un conjugué immunogène comprenant la réaction de
  - (i) un fragment de polymère capsulaire, ayant une longueur de la chaîne d'environ 10 à environ 30 motifs monomères et au moins deux groupes carbonyle, lequel fragment est dérivé du polymère capsulaire d'une bactérie pathogène qui est une bactérie Streptococcus pneumoniae ou Haemophilus influenzae, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et
  - (ii) une toxine ou une anatoxine bactériennes,dans des conditions d'amination par réduction, ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé.
23. Procédé selon la revendication 22, dans lequel le polymère capsulaire est immunogène chez l'homme adulte et moins immunogène chez le nourrisson.

24. Procédé selon la revendication 22, dans lequel l'amination par réduction est effectuée en présence d'anions cyanoborohydrure.
- 5 25. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine diphérique.
26. Procédé selon la revendication 22, dans lequel l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.
- 10 27. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
28. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pseudomonas.
- 15 29. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de staphylococcus.
30. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de streptococcus.
- 20 31. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pertussis.
- 25 32. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de Escherichia coli.
33. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la bactérie pathogène est Haemophilus influenzae type b.
- 30 34. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la bactérie pathogène est Streptococcus pneumoniae.
35. Procédé selon la revendication 22, dans lequel la bactérie pathogène est choisie dans le groupe constitué par Streptococcus pneumoniae sérotypes 6, 12, 14, 19, 23 et 51.
- 35 36. Procédé selon la revendication 26, dans lequel la bactérie pathogène est Haemophilus influenzae type b.
37. Procédé selon la revendication 26, dans lequel la bactérie pathogène est Streptococcus pneumoniae.
- 40 38. Procédé selon la revendication 26, dans lequel la bactérie pathogène est choisie dans le groupe constitué par Streptococcus pneumoniae sérotypes 6, 12, 14, 19, 23 et 51.
39. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 38, dans lequel l'agent oxydant est un periodate.
- 45 40. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 39, dans lequel le fragment est produit à partir d'un polymère capsulaire, d'abord par traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme, puis formation de groupes aldéhyde par traitement avec un agent oxydant.
- 50 41. Procédé pour préparer un conjugué immunogène comprenant : le traitement du produit de l'amination réductrice d'un fragment de polymère capsulaire, ayant au moins deux groupes carbonyle et dérivé du polymère capsulaire d'une bactérie pathogène, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et d'une toxine ou d'une anatoxine bactérienne, ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé, avec la formaline.
- 55 42. Procédé pour préparer un conjugué immunogène comprenant le traitement d'un produit de l'amination réductrice d'un fragment de polymère capsulaire, ayant une longueur de la chaîne d'environ 10 à

environ 30 motifs monomères et au moins deux groupes carbonyle, lequel fragment est dérivé du polymère capsulaire d'une bactérie Streptococcus pneumoniae ou Haemophilus influenzae, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et d'une toxine ou d'une anatoxine bactériennes, ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé, avec la formaline.

43. Procédé selon la revendication 41 ou 42, dans lequel l'anatoxine bactérienne est l'anatoxine diphtérique.
44. Procédé selon la revendication 41 ou 42, dans lequel l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.
45. Procédé selon la revendication 41 ou 42, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
46. Procédé pour préparer un conjugué immunogène comprenant la réaction de
  - (i) un fragment de polymère capsulaire qui a au moins deux groupes carbonyle et qui est dérivé du polymère capsulaire d'une bactérie pathogène, le fragment de polymère capsulaire étant obtenu selon un procédé qui comprend le traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant, et
  - (ii) une toxine ou anatoxine bactériennes, dans des conditions d'amination par réduction, ladite amination par réduction étant effectuée en présence d'ions cyanoborohydrure et ledit conjugué comprenant un conjugué réticulé.
47. Procédé selon la revendication 46, dans lequel le polymère capsulaire est immunogène chez l'homme mature et moins immunogène chez le nourrisson.
48. Procédé selon la revendication 46, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine diphtérique.
49. Procédé selon la revendication 46, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.
50. Procédé selon la revendication 46, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
51. Procédé selon la revendication 46, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de pseudomonas.
52. Procédé selon la revendication 46, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de staphylococcus.
53. Procédé selon la revendication 46, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de streptococcus.
54. Procédé selon la revendication 46, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine du pertussis.
55. Procédé selon la revendication 46, dans lequel la toxine ou l'anatoxine est une toxine ou une anatoxine de Escherichia coli.
56. Procédé selon la revendication 46, dans lequel l'agent pathogène est Haemophilus influenzae type b.
57. Procédé selon la revendication 46, dans lequel l'agent pathogène est Escherichia coli.
58. Procédé selon la revendication 46, dans lequel l'agent pathogène est Neisseria meningitidis.
59. Procédé selon la revendication 46, dans lequel l'agent pathogène est Streptococcus pneumoniae.

60. Procédé selon la revendication 46, dans lequel l'agent pathogène est Pseudomonas.
61. Procédé selon la revendication 48, dans lequel l'agent pathogène est Haemophilus influenzae b.
- 5 62. Procédé selon la revendication 48, dans lequel l'agent pathogène est Streptococcus pneumoniae.
63. Procédé selon l'une quelconque des revendications 46 à 62, dans lequel l'agent oxydant est un periodate.
- 10 64. Procédé selon l'une quelconque des revendications 46 à 63, dans lequel le fragment est produit à partir d'un polymère capsulaire, d'abord par traitement dudit polymère avec un acide, une base ou une enzyme, puis formation de groupes aldéhyde par traitement avec un agent oxydant.
- 15 65. Procédé selon l'une quelconque des revendications 46 à 64, comprenant de plus le traitement avec la formaline dudit produit d'amination par réduction.
66. Procédé selon la revendication 65, dans lequel l'anatoxine bactérienne est l'anatoxine diphtérique.
67. Procédé selon la revendication 65, dans lequel l'anatoxine est CRM<sub>197</sub>.
- 20 68. Procédé selon la revendication 65, dans lequel la toxine ou l'anatoxine bactérienne est la toxine ou l'anatoxine tétanique.
- 25 69. Procédé pour préparer un vaccin qui provoque des taux efficaces d'anticorps anti-polymère capsulaire chez l'homme, comprenant : la préparation d'un conjugué immunogène selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 69 puis la formulation du conjugué obtenu et d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable dans un vaccin.
- 30 70. Procédé pour préparer un fragment de polymère capsulaire qui a au moins deux groupes carbonyle et qui convient à l'utilisation dans la production d'un conjugué immunogène réticulé, qui comprend le traitement d'un polymère capsulaire d'une bactérie pathogène avec un acide, une base ou une enzyme et la formation de groupes carbonyle par traitement avec un agent oxydant.